

Karakter dan Potensi Inokulum Bakteri Fosfat dalam Melepaskan Fosfor The Character and Potential of Phosphate Bacteria Inoculant on Phosphorus Release

Tamad

Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman

Jl. dr. Soeparno Karangwangkal Purwokerto 53123

Email : tamad_1965@yahoo.com

Diterima Februari 2014 disetujui untuk diterbitkan Mei 2014

Abstract

Soil bacteria group which can release soil P-adsorbed is phosphate bacteria (PB). PB can release soil P-adsorbed through: 1) acidification, 2) chelating 3) ligand exchange 4) mineralization and 5) compete colloid sorption site. PB have a potential to release soil P-adsorbed. This study was aimed at determining the character and PB inoculant potential in soil P-adsorbed release. The results of BLASTn PB showed that isolate 1 was *Pseudomonas trivialis*, isolate 5 was *Pseudomonas putida* and isolate 9 was *Pseudomonas fluorescens*. Based on the growth curve on day 5th (the end log. phase) population of *Pseudomonas trivialis* was 1010 CFU/mL, *Pseudomonas putida* was 1014 CFU/mL and *Pseudomonas fluorescens* was 1017 CFU/mL. Storage inoculant PB population decrease 97-84 % and 80-65 % PB lowering capabilities.

Keywords: determination, inoculant, population, release, phosphate bacteria

Abstrak

Penelitian tentang "Adaptasi Anatomis Tanaman Kedelai Varietas Slamet Akibat Perbedaan Ketinggian Tempat" telah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjajaki pengaruh adaptasi tanaman kedelai varietas Slamet pada ketinggian tempat yang berbeda dan membuktikan bahwa ketinggian tempat yang berbeda memberikan adaptasi anatomis yang berbeda pada tanaman kedelai varietas Slamet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketinggian tempat yang berbeda memberikan pengaruh pada ketebalan mesofil kedelai varietas Slamet. Makin tinggi ketinggian tempat makin tebal lapisan mesofilnya. Perbedaan ketinggian tempat tidak memberikan pengaruh pada tebal kutikula, panjang dan lebar stomata, kerapatan stomata dan trikوماتa per mm² luas daun. Ketinggian tempat yang paling mempengaruhi tebal mesofil daun kedelai varietas Slamet adalah 250 m dpl, dengan tebal mesofil 112,40 µm.

Kata kunci: Adaptasi anatomis, Kedelai Slamet,

Pendahuluan

Mikrobia tanah yang mampu melarutkan fosfat dari genus bakteri adalah *Pseudomonas*, *Bacillus*, dan *Escherichia*, dari genus jamur adalah *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Culvularia*, dan dari genus *Actinomicetes* adalah *Streptomyces* (Subba Rao, 1982). Kelompok bakteri tanah yang mampu melepaskan P adalah bakteri fosfat (BF) (Lal, 2002). BF dapat melepaskan P melalui: 1) pengasaman (sitrat, malat, oksalat, glukonat, dan asetat), 2) pengkelatan oleh anion asam organik yang mengandung grup hidroksoil dan karboksil terhadap kation Al, Fe, dan Ca, 3) pertukaran ligan oleh anion organik terhadap fosfat pada Al, Fe dan Ca, sehingga fosfat bebas, dan 4) pengisian loka jerapan koloid oleh asam organik dan sel, karena bermuatan permukaan (Arcand dan Schneider, 2006).

Selain itu, BF berperan meningkatkan potensi tanaman menyerap hara, produksi tanaman, aktivitas dan keanekaragaman hayati dalam tanah, kesehatan tanah dan lingkungan, dan mengawetkan sumber daya alam yang tidak terbarukan (Khan et al., 2007; Mehrvarz dan Chaichi, 2008).

Biofertilizer dikemas dalam bentuk cairan, serbuk atau butiran yang terdiri atas media pembawa dan propagul mikrobia. Media pembawa sekaligus difungsikan sebagai media tumbuh yang dapat memengaruhi kegigasan (viabilitas) dan kemampuan khusus dari mikrobia tersebut (Subba Rao, 1994). Media cair sering digunakan untuk memproduksi inokulum mikrobia tunggal, misalnya inokulum penghasil asam sitrat, penghasil enzim, dan biakan jamur. Mikrobia yang tidak dapat tumbuh/membentuk spora pada media cair

maka penggunaan media padat merupakan pilihannya. Pemilihan media pembawa yang mudah dan murah, namun efektif dan efisien dalam mengembangkan inokulum untuk memproduksi biofertilizer, merupakan inovasi yang perlu dikembangkan untuk menunjang pertanian berkelanjutan.

Pemberian pupuk P yang banyak tidak menjamin ketersediaan P yang banyak bagi tanaman, karena keefesienan P yang rendah, sekitar 10-20 % P. Ketersediaan P yang rendah dalam tanah disebabkan karena P: 1) dijerap oleh koloid anorganik, 2) mengendap sebagai fosfat tidak larut pada kondisi pH asam, dan alkalin dan 3) membentuk kompleks dengan bahan organik (Hawkes et al., 2007). Keuntungan pemanfaatan BF adalah: 1) ramah lingkungan, karena tidak menimbulkan dampak negatif, 2) biaya murah, karena tidak memerlukan bahan baku dan teknologi yang mahal, dan 3) berkelanjutan, karena BF dalam tanah mampu memperbanyak diri dan bertahan untuk musim-musim selanjutnya. Tujuan penelitian ini adalah menentukan karakter dan potensi inokulum BF dalam melepaskan P-terjerap tanah.

Materi dan metode

A. Determinasi Bakteri Fosfat

Determinasi spesies BF isolat 1, 5, dan 9 melalui analisis gen 16S rRNA dilakukan di MACROGEN Inc. (908 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasandong, Geumchun-gu, Seoul 153-781, Korea) terdiri atas: 1) preparasi templet DNA, 2) PCR, 3) purifikasi hasil PCR, 4) sequencing, dan 5) analisis sequen dengan database dari gene bank (Harris dan Hartley, 2003; Janda dan Abbott, 2007).

Analisis hasil gen 16S rRNA tiga isolat BF menggunakan menu BLASTn (Basic Local Aligment Search Tool) nucleotide program MEGA5 pada database gen dari NCBI (National Centre for Biotechnology Information) untuk membandingkan antara sekuen gen contoh dengan sekuen gen data base gen bank spesies bakteri yang diketahui (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997; Pepper dan Gerba, 2004; Kumar et al., 2008).

B. Kurva Tumbuh Bakteri Fosfat

Satu mL biakan (populasi diketahui) isolat BF terdeterminasi diinokulasikan pada 100 mL Pikovskaya cair, selanjutnya

diinkubasikan pada suhu ruang selama dua belas hari dengan penggojogan 100 rpm. Tiap 2x24 jam diambil 1 mL cuplikan untuk ditentukan populasinya dengan metode SPC (standard plate count). Saat tercapainya fase logaritmik merupakan waktu untuk penentuan asam organik dan fase stationer merupakan waktu pemanenan isolat BF untuk dijadikan inokulum (Pepper dan Gerba, 2004).

C. Pengembangan Inokulum Bakteri Fosfat

Isolat BF tunggal, dan konsorsium dua dan tiga isolat dipanen pada akhir fase logaritmik dikembangkan menjadi. Media pembawa inokulum BF cair adalah 20% (v) molase dan 5 gram/Liter ekstrak kedelai. Media pembawa inokulum BF padat ialah campuran (100 mesh) steril 20 % abu sekam, 20 % dedak padi, 20 % onggok tapioka, 3,0 % asam asetat, 2,0 % CuSO₄. 5H₂O, 5 % zeolit, dan 30 % H₂O (Tamad dan Maryanto, 2010). Isolat BF diinokulasikan pada media pembawa 10⁸ CFU/mL sebanyak 10 mL/L atau kg, dan diinkubasikan pada suhu ruang selama satu bulan.

Kestabilan populasi inokulum BF umur 6 dan 12 bulan ditentukan dengan metode SPC. Sedangkan kestabilan kemampuan inokulum BF melarutkan P ditentukan dengan menguji kemampuan melarutkan/memineralkan sumber P (batuan fosfat/RP, Ca-P, Al-P, Fe-P, pNPP, dan Na-fitat) pada medium Pikovskaya cair.

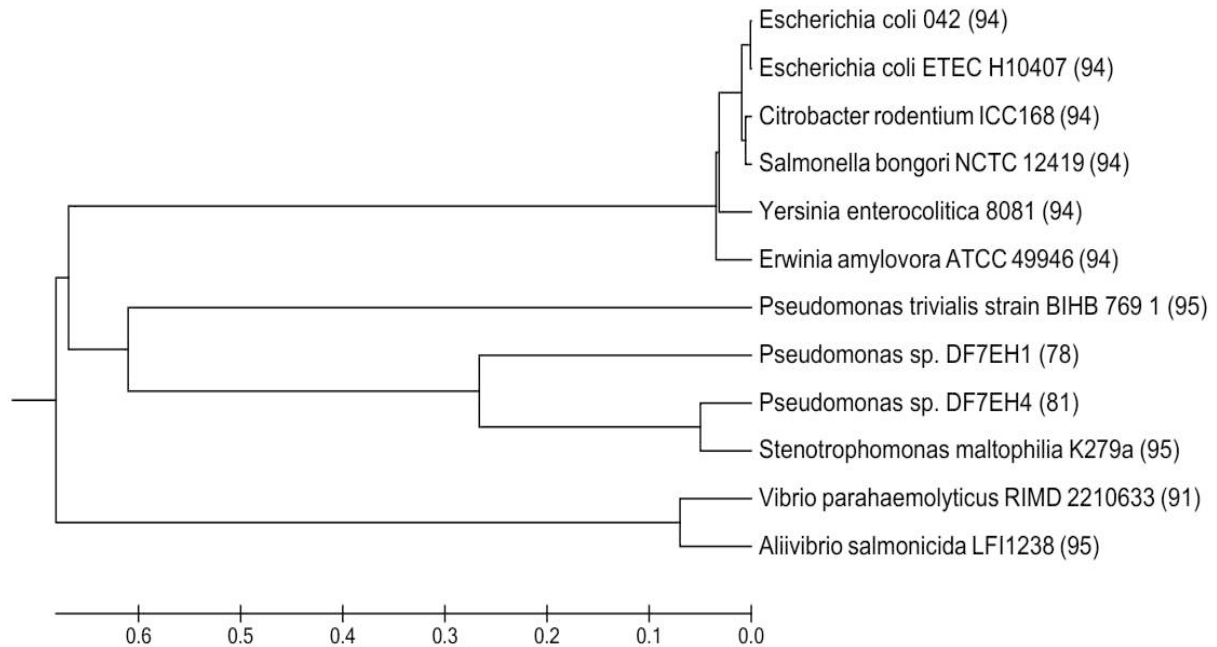
Hasil dan pembahasan

A. Determinasi Bakteri Fosfat

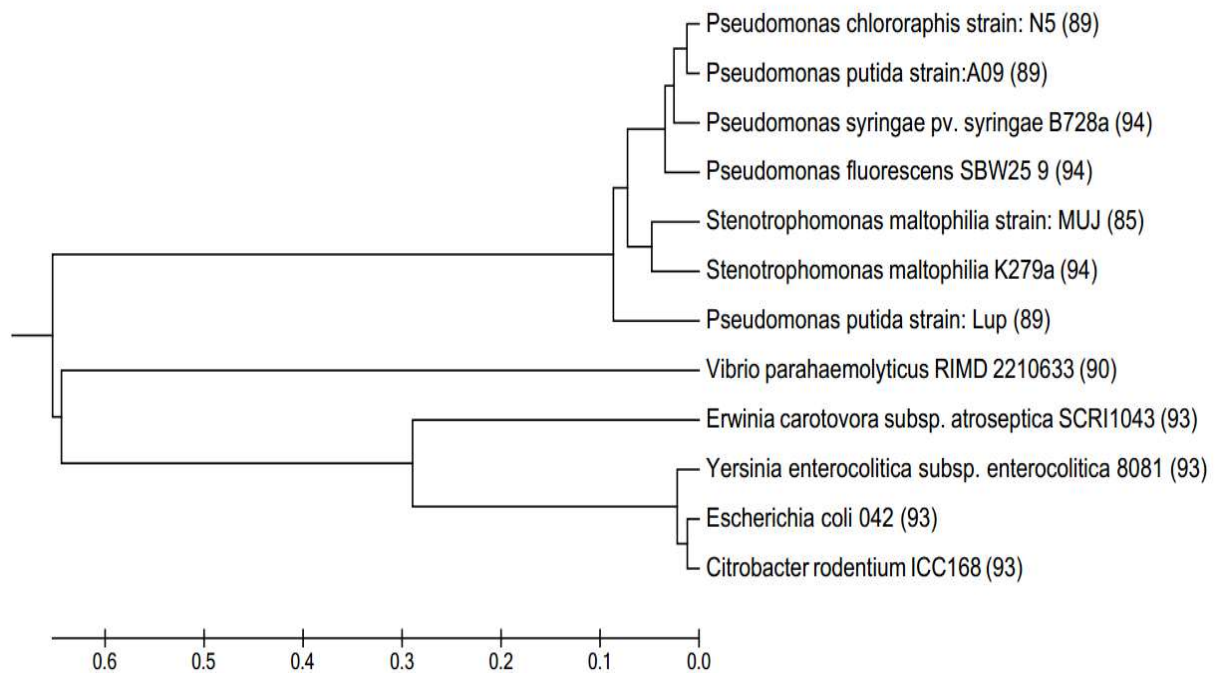
Berdasarkan hasil BLASTn data analisis gen 16S rRNA tiga isolat BF dengan primer amplifikasi 1492R (ggY TAC CTT gTT Acg ACTT) dan primer sequencing 800R (TAC Cag ggT ATC TAA TCC) (Gambar 1) isolat 1 adalah *Pseudomonas trivialis* dengan query coverage sebesar 95 %, e-value max sebesar 0,099 %, QV \geq 16 sebesar 740, QV \geq 20 sebesar 740, dan GC sebesar 51,0 % (BLASTn ID J4PX2VSS013), isolat 5 adalah *Pseudomonas putida* dengan query coverage sebesar 82 %, e-value max sebesar 0,095 %, QV \geq 16 sebesar 569, QV \geq 20 sebesar 301, dan GC sebesar 55,0 % (BLASTn ID J4R1ECDA012), dan isolat 9 adalah *Pseudomonas fluorescens* dengan query coverage sebesar 94 %, e-value max

sebesar 0,099 %, $QV \geq 16$ sebesar 745, $QV \geq 20$ sebesar 743, dan GC sebesar 52,0 % (BLASTn ID J4R7TRV6013) (Ewing et al., 1998; Ewing dan Green, 1998), dan jarak evolusi *Pseudomonas trivialis* dengan

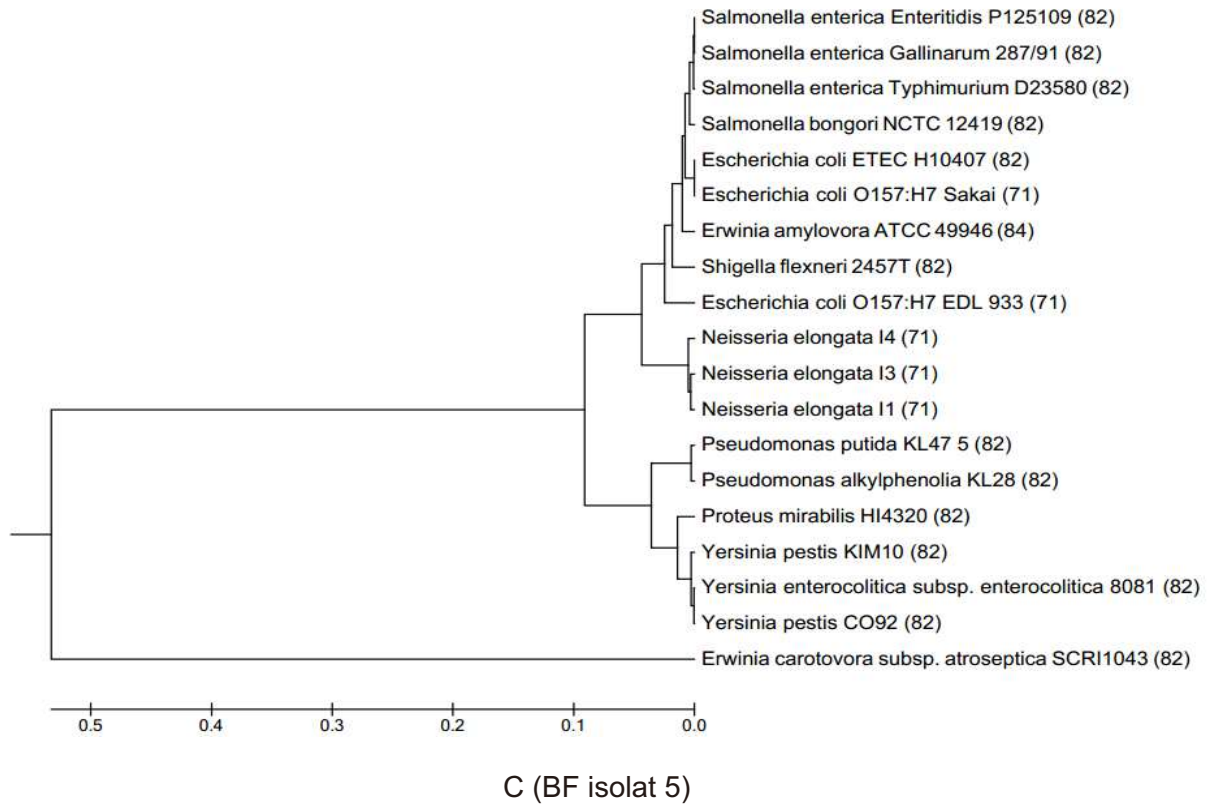
Pseudomonas putida adalah 1,388 μm , dan dengan *Pseudomonas fluorescens* adalah 0,024 μm , sedangkan jarak *Pseudomonas putida* dengan *Pseudomonas fluorescens* adalah 1,409 μm (Tamura et al., 2011).



A (BF isolat 1)



B (BF isolat 9)

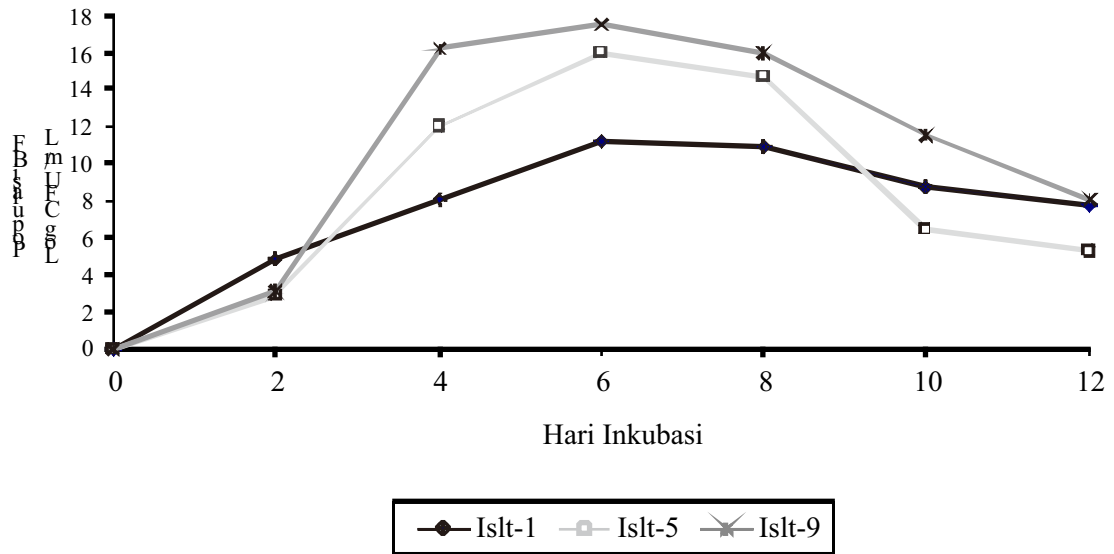


Gambar 1. Filogenetik tiga isolat BF (A = isolat 1, B = isolat 9 dan C = isolat 5)
 Figure 1. Filogenetic of three PB isolates (A = isolate 1, B = isolate 9 and C = isolate 5)

B. Kurva Tumbuh Bakteri Fosfat

Pola pertumbuhan *Pseudomonas trivialis*, *P. putida* dan *P. fluorescens* pada media Pikovskaya selama 12 hari inkubasi pada suhu ruang mirip, walaupun dengan jumlah populasi ketiga isolat BF yang berbeda (Gambar 2), yaitu: 1) fase lag/adaptasi sampai hari ke-2, 2) fase log/eksponensial pada hari ke-2 sampai 5, 3)

fase stationer pada hari ke-5 sampai 8, dan 4) fase decline/kematian mulai hari ke-8 sampai 12 (akhir pengamatan). Hari ke-5 (akhir fase log awal fase stationer) merupakan waktu terbaik untuk pemanenan kultur BF untuk dijadikan inokulum. Berdasarkan kurva tumbuh pada hari ke-5 populasi *Pseudomonas trivialis* adalah 1010 CFU/mL, *P. putida* adalah 1014 CFU/mL dan *P. fluorescens* adalah 1017 CFU/mL.

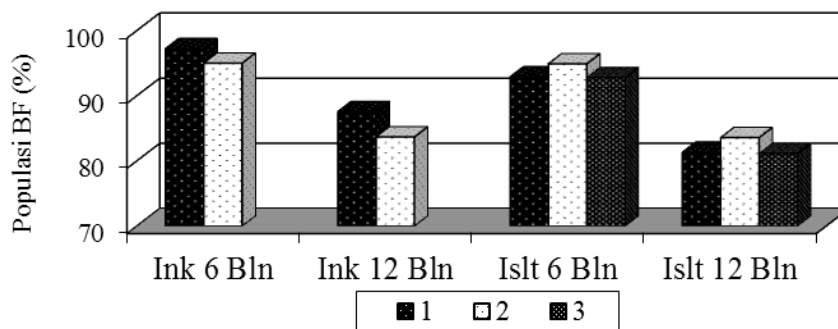


Gambar 2. Kurva tumbuh BF (log CFU/mL) selama 12 HI pada media Pikovskaya pada suhu ruang (Tamad et al., 2011)
 Figure 2. PB growth curve (log CFU/mL) during 12 days on Pikovskaya on room temperature (Tamad et al., 2011)

C. Inokulum Bakteri Fosfat

Penyimpanan menurunkan populasi BF, populasi BF penyimpanan 6 bulan menurun menjadi 95-97 % (log CFU/mL = 8,55-8,74), dan penyimpanan 12 bulan menjadi 84-88 % (log CFU/mL =

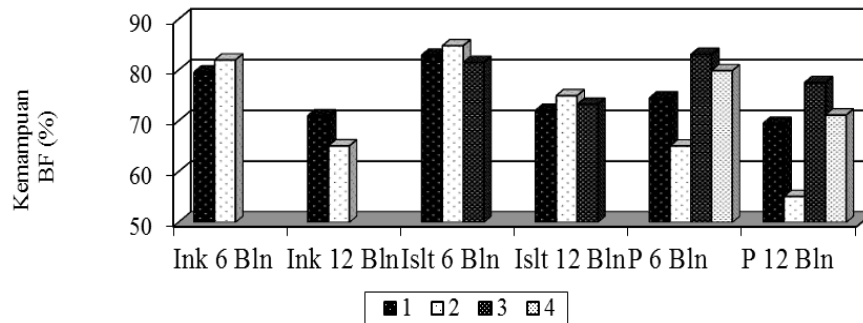
7,53-7,68) (Gambar 3). Penyimpanan 6 bulan menurunkan populasi menjadi 93-95 % (log CFU/mL = 8,35-8,54), dan 12 bulan menjadi 81-84 % (log CFU/mL = 7,30-7,53). Inokulum baik apabila populasi minimal 10⁶-10¹⁰ CFU/g atau mL (Bashan, 1998; Swaminathan, 2007).



Gambar 3. Kestabilan populasi inokulum BF pengaruh lama penyimpanan (inokulum: 1 = cair, 2 = padat; jumlah isolat: 1 = 1, 2 = 2, 3 = 3)
 Figure 3. Population stability of PB inoculant effect of storage time (inoculant 1 = liquid, 2 = solid; isolate number 1 = 1, 2 = 2, 3 = 3)

Daya larut P inokulum BF menurun 65-85 % setelah penyimpanan 6 bulan, dan menurun 55-78 % setelah penyimpanan 12 bulan. Penurunan daya melarutkan P inokulum BF dari sumber P adalah CaP > RP > FeP > AIP (Gambar 4). Daya larut P inokulum BF umur 6 bulan antara cair dan padat tidak berbeda yaitu 80 %, sedangkan

umur 12 bulan inokulum BF cair lebih tinggi (71 %) dibanding padat (65 %). Jumlah isolat inokulum BF tidak berpengaruh terhadap daya melarutkan P, umur 6 bulan menurun menjadi 82-85 %, dan umur 12 bulan menurun menjadi 72-75 %. Inokulum BF baik apabila mampu melarutkan P minimal 30 % (Motsara dan Roy, 2008).



Gambar 4. Kestabilan daya larut P BF pengaruh lama penyimpanan (inokulum: 1 = cair, 2 = padat; jumlah isolat: 1 = 1, 2 = 2, 3 = 3; sumber P: 1 = RP, 2 = CaP, 3 = AIP, 4 = FeP)
Figure 4. P solubility stability of PB effect of storage time (inoculant: 1 = liquid, 2 = solid; isolate number: 1 = 1, 2 = 2, 3 = 3; P source: 1 = RP, 2 = CaP, 3 = AIP, 4 = FeP)

Simpulan

1. Bakteri fosfat isolat 1 ialah *Pseudomonas trivialis*, isolat 5 ialah *P. putida* dan isolat 9 ialah *P. fluorescens*.
2. Hari ke-5 (akhir fase log/awal fase stationer) merupakan waktu terbaik untuk pemanenan kultur BF untuk dijadikan inokulum. Populasi *Pseudomonas trivialis* hari ke-5 adalah 1010 CFU/mL, *P. putida* adalah 1014 CFU/mL dan *P. fluorescens* adalah 1017 CFU/mL.
3. Penyimpanan inokulum BF selama 6 bulan menurunkan populasi menjadi 93-95 %, dan 12 bulan menjadi 81-84 %. Daya larut P inokulum BF umur enam bulan menurun menjadi 82-85 %, dan umur dua belas bulan menurun menjadi 72-75 %.

Daftar Pustaka

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402.

- Arcand, M.M., and K.D. Schneider. 2006. Plant and Microbial Based to Improve the Agronomic Effectiveness of Phosphate Rock : A Review. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78(4): 791-807.
- Bashan Y., 1998. Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacterial for Use in Agriculture. *Biotechnology Advances* 16(4): 729-770.
- Ewing, B., L.D. Hillier, M.C. Wendl, and P. Green. 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assesment. *Genome Research* 8: 175-185.
- Ewing, B., and P. Green. 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Harris, K., and J. Hartley. 2003. Development of broad-range 16S rRNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J. Med. Microbiology* 52: 685-691.
- Hawkes, C.V., K.M. DeAngelis, and M.K. Firestone. 2007. Root Interactions

- with Soil Microbial Communities and Processes. Pp. 1-30. In: Cordon, Z.G., and J.L. Whitbeck. (Eds.). The Rhizosphere: An Ecological Perspective. Academic Press, New York. 210p.
- Janda, J.M., and S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45(9): 2761-2764.
- Khan, M.S., A. Zaidi, and P.A. Wani. 2007. Role of Phosphate-Solubilizing Micro-organisms in Sustainable Agriculture. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 29-43.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley, and K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefing in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Lal, L. 2002. Phosphatic biofertilizer. *Agrotech. Publ. Acad. Udaipur.* 224p.
- Mehrvarz, S., and M.R. Chaichi 2008. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Phosphorus Chemical Fertilizer on Forage and Grain Quality of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 3(6): 855-860.
- Motsara, M.R., and R.N. Roy. 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis. *FAO and Plant Nutrition Bulletin* 19. FAO of UN, Rome.
- Pepper, I.L., and C.P. Gerba. 2004. *Environmental Microbiology. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, New York, 226p.
- Subba Rao, N.S.. 1982. *Biofertilizers in Agriculture*. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, Bombay, Calcuta. 189p.
- , 1994. *Advance in Agriculture Microbiology*. Oxford & IBH Publ. Co. New Delhi, Bombay, Calcuta. 164p.
- Swaminathan, M.S.. 2007. *Ecoenterprises for Sustainable Livelihood Decentralised Production of Biofertilizers-Azospirillum and Phosphobacterial*. JRD Tata Ecotechnology Centre, Taramani Institutional Area, Chennai.
- Tamad, dan J. Maryanto. 2010. *Media Pembawa Alternatif Inokulan Mikrobia Pelarut Fosfat Berbasis Limbah Pertanian*. *Agrin* 14(2):167-176.
- Tamad, Radjagukguk, B., Hanudin, E. and J. Widada. 2011. Seleksi Isolat Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) untuk Mengembangkan Inokulum Efektif. *BIOSFERA* 28(2): 94-103.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (In Press).